

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno, 2017

Dominika Tučková



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ ELEKTROMIGRAČNÍCH METOD PŘI ANALÝZE
LÉČIV.**

THE ELECTROMIGRATION METHODS AND THEIR USE IN THE ANALYSIS OF DRUGS.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Dominika Tučková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1163/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Dominika Tučková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Využití elektromigračních metod při analýze léčiv.

Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše na téma využití izotachoforézy při analýze léčiv.
2. Charakterizace vybraného léčiva.
3. Optimalizace vybrané elektromigrační metody stanovení vybraného léčiva.
4. Přehledné zpracování a zhodnocení získaných výsledků.

Termín odevzdání bakalářské práce: 19.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Dominika Tučková
student(ka)

Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením účinné látky septonex v léčivých přípravcích metodou kapilární izotachofórey. Hlavním cílem je optimalizace metody pro rychlé, citlivé a nenákladné stanovení septonexu.

V bakalářské práci jsou uvedeny chemické a fyzikální vlastnosti septonexu, jeho pozitivní a negativní vlivy využitelné v lékařství a shrnutí možných metod analýzy. Dále shromažďuje informace o lécích s obsahem septonexu dostupných na českém trhu. Následující kapitoly práce shrnují teorii elektromigračních metod, jejich principy, analytické zařazení a využití při analýze septonexu.

V závěru práce jsou uvedeny optimální podmínky analýzy a výsledky stanovení účinné látky septonexu v přípravku Septonex sprej, který je dostupný na českém trhu, kapilární izotachofórou. V práci jsou porovnány stanovené obsahy septonexu v tomto přípravku s obsahem septonexu, který je v tomto léčivu deklarovaný výrobcem.

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the determination of septonex, effective component in medical agents, using capillary isotachopheresis. The main aim is optimization of this method for fast, sensitive and inexpensive determination of septonex.

In bachelor thesis chemical and physical properties of septonex are introduced as well as its negative and positive properties, which can be used in medicine, and summary of possible methods of analysis. Further this thesis gathers information about drugs containing septonex and available on Czech market. Following chapters of the thesis summarize theory of electromigration methods, their principles, analytical devices and their use for septonex analysis.

Finally, the thesis presents optimal conditions for analysis and results of determination of septonex in drug Septonex spray, which is available on Czech market, using capillary isotachopheresis. Content of determined septonex is compared to amount of septonex contained in this drug, which is declared by producer, in this thesis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Izotachofórea (ITP), elektromigrační metody, septonex, karbethopendeciniumbromid (CPB)

KEY WORDS

Isotachopheresis (ITP), electromigration methods, septonex, Carbethopendecinium bromide (CPB)

TUČKOVÁ, D. *Využití elektromigračních metod při analýze léčiv..* Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 36 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Veronika Řezáčová, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce Ing. Veronice Řezáčové, Ph.D. za trpělivost, ochotu, cenné rady a odborné vedení při psaní této bakalářské práce.

Dále bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za podporu během studia a pomoc při psaní bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému psovi, Maximovi, za pomoc při zvládání stresových situací.

Obsah

1 Úvod.....	7
2 Teoretická část.....	8
2.1 Septonex	8
2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti a účinky	8
2.2 Septonex v léčivých přípravcích	9
2.2.1 Septonex kožní sprej	9
2.2.2 Ophthamo-Septonex, oční mast	9
2.2.3 Mesocain, uretrální gel.....	10
2.2.4 Otipur, ušní kapky.....	10
2.3 Možnosti stanovení Septonexu.....	10
2.3.1 Stanovení Septonexu kapilární izotachoforézou.....	11
2.4 Elektromigrační metody	11
2.4.1 Historie elektromigračních metod.....	12
2.4.2 Elektrokinetické jevy	13
2.4.2.1 Elektroforéza	13
2.4.2.2 Elektroforetická pohyblivost	13
2.4.2.3 Elektroosmotický tok (EOF)	14
2.4.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE).....	14
2.4.4 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)	15
2.4.5 Kapilární elektrochromatografie (CEC).....	15
2.4.6 Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF).....	15
2.4.7 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC).....	16
2.5 Kapilární izotachoforéza (CITP)	16
2.5.1 Princip	16
2.5.2 Průběh izotachoforézy.....	17
2.5.3 Základní charakteristika izotachoforetických zón	18
2.5.4 Instrumentace	18
2.5.4.1 Kapiláry.....	18
2.5.4.2 Detektory	18
2.5.5 Vyhodnocení	19
2.5.5.1 Kvalitativní analýza.....	19
2.5.5.2 Kvantitativní analýza.....	19
2.5.6 Využití.....	19

2.5.6.1 Kombinace CITP a CZE.....	20
3 Experimentální část.....	21
3.1 Použité chemikálie.....	21
3.2 Použité přístroje a zařízení	21
3.3 Software použitý pro zpracování dat.....	22
3.4 Příprava a výběr elektrolytů	22
3.4.1 Vedoucí elektrolyt.....	22
3.4.2 Koncový elektrolyt.....	23
3.5 Podmínky analýzy	23
3.6 Optimalizace metody.....	23
3.7 Metoda standardního přídatku	23
3.8 Statistické zpracování naměřených dat	24
3.8.1 Dean-Dixonův test	24
3.8.2 Interval spolehlivosti.....	24
3.8.3 Mez detekce a kvantifikace.....	25
4 Výsledky a diskuze	26
4.1 Optimalizace metody stanovení	26
4.1.1 Kalibrační křivka	26
4.1.2 Výběr vhodného ředění.....	27
4.1.3 Výběr vhodné koncentrace přídatku	27
4.1.4 Výběr vhodného množství přídatku.....	28
4.2 Analýza reálných vzorků.....	29
4.3 Výsledky stanovení množství septonexu v reálných vzorcích.....	30
5 Závěr.....	33
6 Seznam použitých zdrojů	34
7 Seznam použitých zkratk.....	36

1 ÚVOD

V dnešní době se velké množství drobných poranění ošetřuje v domácím prostředí přípravky, které jsou volně dostupné bez lékařského předpisu. Některé přípravky však obsahují látky, které ve vyšší koncentraci ošetřovanému jedinci mohou spíše přitížit.

S nárůstem množství těchto látek, roste i potřeba jejich rychlého a spolehlivého stanovení vhodnými analytickými metodami. Tyto metody by měly dokázat přesně, rychle a nenákladně stanovit kvalitu i kvantitu použitých účinných látek v analyzovaném přípravku.

Mezi hojně používané látky můžeme zařadit i septonex vyskytující se v mnoha dostupných přípravcích. Septonex se využívá na povrchovou dezinfekci nepříliš rozsáhlých ran, především díky jeho baktericidním a částečně antimykotickým účinkům. U některých jedinců nebo při častém podávání této účinné látky může dojít k přecitlivělosti.

Rychlá a spolehlivá analytická metoda pro stanovení septonexu zatím chybí. Přípravek s podobným spektrem účinků jaký nabízí septonex u nás ovšem není k dispozici. Z tohoto důvodu je příhodné najít vyhovující analytickou metodu pro jeho stanovení. Použití analytických metod ze skupiny elektromigračních technik se jeví jako velmi vhodné a může konkurovat chromatografii.

Cílem práce je optimalizovat stanovení septonexu s využitím izotachofórey, jakožto rychlé, selektivní a nenákladné metody pro použití při analýze léčiv dostupných na českém trhu, stanovit obsah septonexu ve vybraných léčivech a porovnat tyto získané hodnoty s obsahem, který je deklarovaný výrobcem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Septonex

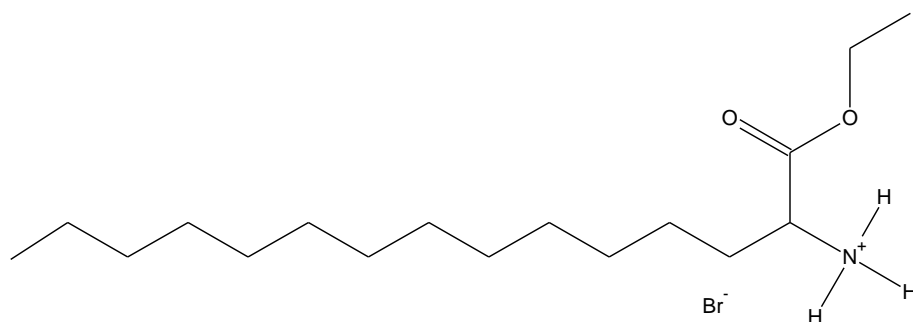
2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti a účinky

Septonex je obchodní označení účinné látky karbethopendeciniumbromid, což je krystalický prášek charakteristického slabého zápachu, bílé až nažloutlé barvy.

Chemický název je [1-(ethoxykrybonyl)pentadecyl]trimethylamoniumbromid [1]. Další možná označení látky jsou uvedena v tabulce (Tabulka 1). V textu je dále používána zkratka CPB. Strukturní vzorec je uveden na obrázku (Obrázek 1).

Tabulka 1: Možné pojmenování CPB [1]

Synonymum	Způsob označení
Karbethopendeciniumbromid	triviální
Carbethopendeciniibromidum	latinské
Ethyl-2-(trimethylamonio)hexadekanoát bromide	IUPAC
Carbethopendecinium bromide	anglické
Septonex	obchodní



Obrázek 1: Strukturní vzorec CPB

Látka je snadno rozpustná v 96% ethanolu a chloroformu. Ve vodě je septonex obtížně rozpustný a jeho vodný roztok silně pění. Látka je uvedena v Českém lékopise 2005 v Národní části, ale v dostupných zahraničních lékopisech se nevyskytuje [1]. Základní chemická charakteristika látky je uvedena v tabulce (Tabulka 2).

Tabulka 2: Chemická charakteristika CPB [1]

Sumární vzorec	$C_{21}H_{44}BrNO_2$
Molekulová hmotnost	422,29
Teplota tání	153-156 °C
Registrační číslo CAS	10567-02-9

CPB patří mezi tenzidy. Jedná o povrchově aktivní látku ze skupiny kvartérních amoniových solí s mírným antiseptickým účinkem.

Přítomnost kvartérní amoniové skupiny ve struktuře molekuly je charakteristická pro některá významná léčiva z různých farmakologických skupin. Za povrchovou aktivitu u CPB odpovídá kation čtyřvazného dusíku.

CPB je součástí monokomponentních i polykomponentních léčivých přípravků, kde obvykle představuje hlavní aktivní látku. Tuto roli plní například u přípravku Septonex kožní sprej. V některých případech se může jednat pouze o látku pomocnou. V takových případech je CPB pouze dezinfekční a antimikrobiální přísadou. Jedním z těchto přípravků je Mesocain.

Ve farmacii se využívají hlavně baktericidní a částečně antimykotické účinky. Jeho baktericidní vlastnosti spočívají ve vyvolání změny v permeabilitě buněčné membrány bakterií, čímž dojde k jejímu narušení. U gram-pozitivních bakterií je baktericidní účinek CPB výraznější než u gram-negativních bakterií. CPB je neúčinný proti některým bakteriím (například *Pseudomonas* a *Mykobakterium tuberculosis*), nepůsobí na viry a spory. Optimálně působící v neutrálních nebo slabě alkalických roztocích. Baktericidní účinek klesá s klesajícím pH a naopak roste s přidávkou alkoholu.

Při používání přípravku jako lokálního antiseptika nebo dezinfekčního prostředku může dojít ke vzniku senzibilizace až alergie u citlivějších osob nebo při opakovaném podání [2], [3].

2.2 Septonex v léčivých přípravcích

2.2.1 Septonex kožní sprej

Účinná látka CPB v přípravku brání rozmnožování bakterií a některých virů v ráně zejména při delší expozici. Slouží k dezinfekci drobných kožních poranění. Dále se uplatňuje při léčbě drobných kožních hnisavých ran, které se projevují zarudnutím, mokváním a posléze strupy, a to i při výskytu ve vlasech. Jeho použití zahrnuje i dezinfekci pooperačních jizev nebo píštělí. Přípravek je určen k zevnímu užití.

Jedním z nežádoucích účinků je možnost kontaktní precitlivělosti, zvláště po opakovaném používání a pouze u precitlivělých osob. U pacientů s popáleninami a toxickou epidermální nekrolýzou je nutno monitorovat osmolalitu.

Přípravek je k dostání ve 30 ml, 45 ml a 100 ml nádobkách z polyethylenu nebo ze skla, doplněných o mechanickou pumpičku s rozprašovačem. Přípravek je dostupný v lékárnách bez lékařského předpisu.

Septonex kožní sprej má homogenní vzhled červeno-oranžové čiré tekutiny charakteristického zápachu. Přípravek obsahuje dvě účinné dezinfekční látky, CPB v koncentraci 8,3 mg v 1 ml a propylenglykol. Pomocné látky nacházející se v přípravku jsou povidon 25, ethanol 96%, oranžová žluť, ponceau 4R a čistá voda [4], [5].

2.2.2 Ophthamo-Septonex, oční mast

Oční mast je určena k léčbě akutních a chronických nehnisavých konjunktivitid a blefaritid, pro léčbu oka po extrakci cizích tělísek z rohovky a poúrazové infikované eroze rohovky.

V rámci nežádoucích účinků může dojít k porušení integrity kůže a podkožní tkáň doprovázené pálením, svěděním a vyrážkou.

Přípravek je k v dostání hliníkové tubě o obsahu 5 g oční masti. Lék lze zakoupit v lékárně bez lékařského předpisu.

Ophthalm-Septonex, oční mast, má homogenní vzhled bílé až nažloutlé barvy. Přípravek obsahuje účinnou CPB 5 mg (0,1%) v 5 g masti a pomocnou látku tuk z ovčí vlny (lanolin). Další pomocné látky v léčebném přípravku jsou oční bílá vazelína, bílý vosk, čistá voda [6], [7].

2.2.3 Mesocain, uretrální gel

Uretrální gel Mesocain má dobré anestetické a antiseptické účinky, působí tlumivě na grampozitivní koky. Používá se ke zlepšení klouzavosti zaváděných cévek a jako prevence bolesti při instrumentálním urologickém vyšetření.

Přípravek patří ke skupině léků, která může ovlivňovat pozornost. Gel může ojediněle způsobovat porušení integrity kůže a podkožní tkáně, hypotenzi, bronchospasmus a zvýšení střevní peristaltiky.

Přípravek je balen v hliníkové tubě s plastovým šroubovacím uzávěrem o obsahu 20 g gelu. Lék je dostupný v lékárně pouze na předpis.

Mesocain má konzistenci průhledného gelu. Přípravek obsahuje dvě aktivní látky trimecainihydrochloridum v koncentraci 200 mg na 20 g gelu a CPB v koncentraci 40 mg na 20 g gelu. Pomocné látky nacházející se v přípravku jsou hyetelosa, methylparaben, čistá voda [8], [9].

2.2.4 Otipur, ušní kapky

Ušní kapky Otipur je léčivo používané ve veterinární medicíně. Otipur slouží k šetrnému vyčištění zevního zvukovodu psů a koček. Přípravek rozpouští cerumen a nečistoty, umožňuje další léčbu případných otitid. Léčivo není určeno pro potravinová zvířata.

Ušní kapky jsou k dostání v 60 g a 200 g balení. Roztok je volně prodejný. Roztok je čiré barvy. Přípravek obsahuje aktivní látku CPB v koncentraci 5 mg na 1 g roztoku [10].

2.3 Možnosti stanovení Septonexu

V průběhu práce bylo již zmíněno, že CPB patří mezi povrchově aktivní látky. Vlastnosti těchto látek značně ovlivňují měřené parametry v analytických metodách. Těchto vlivů se využívá při stanovení jich samotných nebo jsou využívány jako pomocné látky pro stanovení látek jiných. Jednou z hlavních oblastí využití povrchově aktivních látek je spektrofotometrie. Dále také využívají ve spektrofluorimetrii, atomové absorpční spektrometrii, chromatografii a elektrochemických metodách.

V českém lékopise je metoda pro stanovení CPB jako substance uvedena v národní části. V první řadě se provede zkouška na ztrátu sušením, 1,00 g se suší při 100 až 150 °C v sušárně. Tato sušina je následně použita pro stanovení obsahu analytu. Konkrétně se 0,30 g vysušené látky z předchozího kroku rozpustí ve 20 ml kyseliny octové bezvodé, přidá se 6 ml octanu rtuťnatého a titruje se kyselinou chloristou 0,1 mol·dm⁻³. Jako indikátor je použita krystalová violet, změna fialového zbarvení na modré. 1 ml kyseliny chloristé 0,1 mol·dm⁻³ odpovídá 42,25 mg C₂₁H₄₄BrNO₂ [1].

Koula a kol. použil pro stanovení CPB metodu založenou na extrakci iontových párů ve spojení s diferenční pulzní polarografií. Metoda je vhodná pro stanovení kvartérních amoniových sloučenin (CPB) a organických bází v koncentracích až 10⁻⁷ mol·dm⁻³. Metodou byl stanovován septonex, tetrapentylammoniumbromid a kodein [11].

Kopecký a kol. použil potenciometrii ke studiu inkluzních komplexů CPB s α - a β -cyklodextriny. Poté také s modifikovanými cyklodextriny jako například hydroxypropyl- α -cyklodextrin nebo methyl- β -cyklodextrin [12].

V poslední době se jako vhodná, rychlá a selektivní metoda nejvíce používá HPLC. Poskytuje současně jak kvantitativní, tak kvalitativní informaci. Stanovení není rušeno dalšími složkami v léku a vysoká citlivost umožňuje stanovit i stopových nečistot.

2.3.1 Stanovení Septonexu kapilární izotachoforézou

Pro izotachoforetické stanovení účinné látky CPB byly nalezeny dva aplikační listy [13], [14], kde je popsán podrobný postup.

U přípravků Mesosept sprej, Septonex sprej a Septonex ColourSprej je určité množství zkoumaného vzorku doplněno methanolem a následně bez větších úprav analyzováno. Pokud je analyzován vzorek s vyšším obsahem sodíku, příp. eferfinu (Mukoseptonex, Mukoseptonex E) je vhodné nejprve použít metodu extrakce tuhou fází, a tím vzorek upravit k následné analýze. Pro zvýšení přesnosti stanovení je doporučováno použít vnitřní standard bis-tris-propan.

Podmínky analýzy: vedoucí elektrolyt: 10 mM octan amonný + 10 mM kyselina octová v 99% ethanolu, koncový elektrolyt: 10 mM MgCl_2 v 99% methanolu, hnací proud: počáteční 50 μA , koncový 20 μA , doba analýzy: 15 minut, mód analýzy: kationtový [13].

U analýzy přípravků Septonex sprej, Ophthalmo-Septonex oční kapky a Mukoseptonex nebo Mukoseptonex E nosní kapky je vhodné pro zvýšení přesnosti stanovení použít metodu vnitřního standardu. Jako vnitřní standard jsou použity ionty Li^+ (citronan lithný). Vzorek pro analýzu se připraví smícháním určitého množství přípravku s methanolem a následným přidáním vnitřního standardu. Vhodná je předúprava vzorku s vyšším obsahem sodíku, příp. efedrinu (Mukoseptonex, Mukoseptonex E) metodou extrakce tuhou fází.

Podmínky analýzy: vedoucí elektrolyt: 10 mM kyselina octová + 10 mM octan amonný v 50% methanolu, koncový elektrolyt: 10 mM kyselina octová v 50% methanolu, hnací proud: počáteční 60 μA , koncový 20 μA , doba analýzy: 35 minut, mód analýzy: kationtový [14].

2.4 Elektromigrační metody

Elektromigrační analytické metody jsou určeny pro separaci a následnou detekci látek nesoucích náboj jim vlastní nebo získaný interakcí s jinou látkou [15].

Principem separace složek zkoumaného vzorku v rámci elektromigračních technik je primárně rozdílná elektroforetická pohyblivost jednotlivých analytů ve vzorku. Pohyb nabitě částice je vyvolán působením elektrického pole v roztoku (elektrolytu). Částice s kladným nábojem se pohybují k záporně nabitě elektrodě (katodě) a záporně nabitě částice se pohybují směrem opačným ke kladně nabitě elektrodě (anodě) [16].

V rámci elektromigračních technik má velký význam konkrétní elektroforetická pohyblivost částice a další elektrokinetické jevy (elektroforéza, elektroosmotický tok). Tyto jevy se uplatňují při analýze složitých anorganických i organických látek a při zkoumání různých biochemicky zajímavých soustav. Pro analýzu jsou nežádoucí změny teplot, jiné druhy transportu látek (difúze, konvekce) a vliv gravitace na látky o vyšší hustotě, kdy dochází k promíchávání zón v horizontálním uspořádání [16].

Uplatňuje se řada modifikací, kde se může použít jak samotné elektroforézy a její kombinace s elektroosmózou, tak i dalších separačních principů. Tyto modifikace využívají odlišných elektroforetických pohyblivostí a dalších rozdílů v chování analytů v daném prostředí [17].

U elektromigračních technik je možné rozlišit plošné a kapilární uspořádání. Plošným nosičem je papír či gel, který je napuštěn základním elektrolytem a umístěn do elektroforetické komory. Pokud separace probíhá v kapiláře jedná se o kapilární uspořádání [17].

Do kapilárních elektromigračních metod řadíme celkem šest základních technik, které se liší použitým médiem a principem separace. Jsou to tyto metody [18]:

- Kapilární zónová elektroforéza (CZE)
- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)
- Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)
- Kapilární izotachoforéza (CITP)

Všechny kapilární elektromigrační techniky se vyznačují především malou spotřebou vzorku a činidel potřebných pro separaci, vysokou rychlostí, velkou účinností analýzy a krátkou dobou potřebnou na optimalizaci separačních podmínek. Hlavní nevýhodou těchto technik je jejich nižší citlivost a menší reprodukovatelnost [18].

2.4.1 Historie elektromigračních metod

První experimenty s migrací iontů v trubicích tvaru U byly prováděny již na samém počátku 19. století. V roce 1892 byl popsán pohyb anorganických částic v elektrickém poli v koloidním roztoku. Následně bylo zjištěno, že podobně putují i proteiny ve vodných roztocích. V roce 1897 odvodil německý chemik F. Kohlrausch regulační funkci, kvantitativně popisující vztah mezi koncentrací a pohyblivostí iontů v elektrickém poli [18], [19].

V 30. letech 20. století bylo zkonstruováno zařízení umožňující rozdělit proteiny krevního séra na základě jejich rozdílných rychlostí pohybu v elektrickém poli. V roce 1948 byla za tento objev udělena Nobelova cena švédskému elektrotechnikovi Arnesovi Tiseliusovi [19].

V 50. letech minulého století, kdy se začala elektroforéza více používat, se rozvíjela především gelová elektroforéza. Byla používána pro separaci aminokyselin a anorganických iontů. V polovině 60. let 20. století vznikly izoelektrická fokusace a kapilární izotachoforéza. Izotachoforéza byla určena převážně pro analýzu směsi malých iontů, a to anorganických i organických. Tyto tři zmíněné metody jsou založeny na odlišných principech a používají různá prostředí (polymerní gel, papír a kapilára). V roce 1958 provedl švédský chemik S. Hjertén první elektroforetický experiment v rotující kapiláře [18], [20].

V roce 1981 J. W. Jorgenson a K. D. Lukacsová popsali separaci různých iontů zónovou elektroforézou ve velmi tenké skleněné kapiláře. Zavedli používání kapilár do elektroforézy. S. Terabe v roce 1984 poprvé využil tenzid pro separaci neutrálních látek, čímž vznikly základy pro micelární elektrokinetickou chromatografii. První komerčně dostupný přístroj pro kapilární elektromigrační metody se objevil na trhu v roce 1988 [18], [20].

2.4.2 Elektrokinetické jevy

2.4.2.1 Elektroforéza

Termín "elektroforéza" pochází z řečtiny a obecně znamená transport pomocí elektřiny. Užívá ve dvou významech. Buď označuje elektrokinetický jev, nebo název elektromigrační techniky založené na tomto jevu.

Elektrokinetický jev označuje pohyb elektricky nabitých částic v elektrolytu vlivem působení elektrického pole. Pohyb iontů je v elektrickém poli vyvolán díky elektrostatickému přitahování elektrického náboje k opačně nabitě elektrodě [18]. Kladně nabitě částice jsou unášeny ke katodě a záporně nabitě částice k anodě. Částice, které nenesou žádný náboj, nejsou elektrodami přitahované ani odpuzované [16].

2.4.2.2 Elektroforetická pohyblivost

Elektroforetická pohyblivost (μ_e) nabitě částice udává rychlost jejího pohybu vůči rozpouštědлу, která byla vyvolána elektrickým polem o jednotkové intenzitě. Tato rychlost je velmi malá, řádově $10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [15]. Pro elektroforetickou pohyblivost platí vztah:

$$\mu_e = \frac{v}{E} \quad (1)$$

Na nabitou částici o náboji Q působí v elektrickém poli o intenzitě E dvě síly. Jednou z nich je elektrická síla F_1 , která uvádí částice do pohybu. Druhá síla je odpor viskózního prostředí F_2 , která brzdí pohyb částice. Platí vztahy:

$$F_1 = Q \quad (2)$$

$$F_2 = k \cdot v \quad (3)$$

Koeficient k závisí na tvaru a velikosti částice a na viskozitě prostředí η , v je rychlost pohybující se částice. Pokud je počáteční rychlost v nulová, částice je uvedena do zrychleného pohybu silou F_1 . S rostoucí rychlostí v se zvětšuje síla F_2 , dokud se nevyrovná síle F_1 . Následně nastane rovnovážný stav, ve kterém se nabitě částice pohybují stálou rychlostí.

$$F_1 = F_2 \rightarrow Q \cdot E = k \cdot v \quad (4)$$

Pro elektroforetickou pohyblivost částice platí vztah:

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{Q}{k} \quad (5)$$

Jestliže jsou částice na začátku separace v jednom místě, dostávají se v průběhu separace dopředu nabitě částice, které mají větší pohyblivost, a částice s menší pohyblivostí se opoždují. Tím dochází k separaci těchto částic [17].

Na pohyblivost jednotlivých částic má vliv více faktorů, které můžeme rozdělit na fyzikálně chemické vlastnosti samotných částic a vlastnosti prostředí. Do první skupiny se řadí celkový náboj, velikost a tvar částic, disociovatelnost, schopnost adsorpce iontů a polárních molekul a dále například i tvorba komplexů. Většina z těchto faktorů je ovlivňována prostředím. Volbou pH lze ovlivnit disociaci slabých kyselin a zásad. Přítomnost

jiných elektrolytů ovlivňuje iontovou sílu, a tím mění podmínky pro separaci. Do druhé skupiny se řadí elektrolyty, které se v těchto technikách používají. Zpravidla jsou to tlumivé roztoky o určité koncentraci, pH, iontové síle, vodivosti, teplotě, permeabilitě a viskozitě. Jako další migraci ovlivňují vlastnosti elektrického pole a nosiče, ve kterých migrace probíhá [21].

2.4.2.3 Elektroosmotický tok (EOF)

Elektroosmotický tok je tok celkového objemu kapaliny v kapiláře při vložení elektrického pole, ke kterému dochází díky vzniklému povrchovému náboji na vnitřní stěně kapiláry [17].

Disociací vnitřního povrchu křemenné nebo skleněné kapiláry se vytváří záporný náboj stěny. Vzniklý náboj na vnitřním povrchu kapiláry musí být vyvážen opačným nábojem z okolního prostředí. Na disociovanou vnitřní stěnu jsou vázány kationty z elektrolytu, což vyvolá elektroneutralitu systému. Tato představa se vysvětluje vznikem stabilní elektrické dvojvrstvy [16].

Kationty vzdálenější od stěny kapiláry tvoří difúzní vrstvu, která působením elektrického pole migruje směrem ke katodě. Kationty H^+ bývají silně hydratovány a jejich pohyb společně s asociovanými molekulami vody vyvolá tok celého roztoku k detektoru umístěnému před katodou. Tento jev je označován jako elektroosmóza a tok se označuje jako elektroosmotický. EOF je tak silný, že nese ke katodě i anionty. Roztok se tedy pohybuje jako celek.

Neutrální částice se pohybují rychlostí EOF, a proto nemohou být od sebe separovány. Naopak částice nabitě se pohybují rychleji (kationty) nebo pomaleji (anionty) v závislosti na jejich elektroforetické pohyblivosti. Kationty a anionty mohou díky tomu být separovány společně během jedné analýzy. Úroveň EOF je velmi závislá na pH základního elektrolytu. Čím vyšší je pH roztoku uvnitř kapiláry, tím větší negativní náboj je rozprostřen po vnitřní stěně kapiláry, a tím je EOF rychlejší [17], [18], [22].

Mezi stabilní elektrickou vrstvou a difúzní vrstvou se vytvářejí potenciálové rozdíly. Stabilní vrstvě přísluší potenciál ψ . Difúzní vrstvě přísluší potenciálový rozdíl, který se nazývá elektrokinetický potenciál, zeta potenciál ζ . Pohyblivost elektroosmotického toku lze vyjádřit rovnicí:

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (6)$$

kde ε je permitivita základního elektrolytu, ζ je zeta potenciál, r je poloměr iontu a η je viskozita elektrolytu [17].

2.4.3 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

CZE je nejjednodušší a nejuniverzálnější elektromigrační metoda. Používá se pro separaci nabitých částic, ale nehodí se pro stanovení neutrálních molekul. Během jedné analýzy lze stanovit oba dva druhy iontů, kationty i anionty [18].

V CZE je kapilára naplněna základním elektrolytem o konstantním složení, který vede elektricky proud. Její konce jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem společně s elektrodami z inertního materiálu, na které je aplikováno vysoké napětí. Prostory, kde probíhá separace, jsou odděleny od prostoru elektrod vhodnou membránou.

Do konce kapiláry je dávkován malý objem vzorku, který migruje v prostředí elektrolytu. Kapilára prochází přes detektor, obvykle fotometrický. Záznam závislosti odezvy detektoru

na čase se nazývá elektroforegram či elektroforeogram (starší označení). Podle záznamu je následně určována kvalita a kvantita. Kvalitu určuje poloha píků a kvantitu výška píků [15], [17].

Separace probíhá na základě různé elektroforetické pohyblivosti analytů v elektrickém poli. V CZE se velkou měrou uplatňuje působení EOF. Za normálních podmínek, kdy je povrch kapiláry nabitý záporně, směřuje EOF ke katodě. Rychlost EOF je podstatně vyšší než elektroforetická pohyblivost iontů. Z toho vyplývá, že nabitě a současně i nenabitě částice se vlivem působení EOF pohybují ke katodě. Kationty se pohybují nejrychleji, protože jejich vlastní elektroforetická pohyblivost a EOF směřují ke katodě. Neutrální částice budou směřovat ke katodě rychlostí EOF, ale nebudou separovány. Anionty se pohybují ke katodě nejpomaleji, protože jejich elektroforetická pohyblivost směřuje k anodě [16].

2.4.4 Kapilární gelová elektroforéza (CGE)

CGE je nejpoužívanější metoda k separaci biomolekul (např. bílkoviny nebo nukleové kyseliny) na základě jejich rozdílné velikosti. Velké biomolekuly mají velmi blízký poměr náboje k hmotnosti, který se s velikostí biomolekuly výrazně nemění. Jejich elektroforetické pohyblivosti si mohou být velice blízké, a proto při použití klasického tlumivého roztoku nedochází k dobře rozlišitelné separaci [16].

Účinné separace je dosaženo pomocí gelu, kterým je kapilára naplněna. Tyto gely jsou nejčastěji tvořené polyakrylamidem nebo agarózou. Gel v kapiláře vytváří složitou polymerní síť s póry, jimiž molekuly migrují v závislosti na své velikosti.

Molekuly menší než je velikost pórů nejsou gelem zadržovány a migrují jako první. Jestliže molekuly mají velikost srovnatelnou s velikostí pórů jsou zadržovány pouze slabě. Nejvíce jsou zadržovány velké molekuly, a proto migrují nejpozději [15].

Gel nevytváří pouze prostředí pro separaci, ale současně zabraňuje konvekci a elektroosmóze a minimalizuje adsorpci a difúzi roztoku. Absence EOF znamená, že metodou GCE mohou být stanovovány pouze částice nesoucí náboj. Současně platí, že během jedné analýzy mohou být separovány pouze kationty nebo anionty [16].

2.4.5 Kapilární elektrochromatografie (CEC)

CEC kombinuje principy kapilární elektroforézy a vysoko účinné kapalinové chromatografie. Kombinace těchto dvou mechanismů umožňuje analyzovat neutrální i nabitě částice, a to od jednoduchých až po makromolekuly [17], [18].

Pro separaci se používá stacionární a mobilní fáze. V koloně naplněné stacionární fází se vytváří elektrické pole a vzniká EOF. Mobilní fáze, která transportuje analyt, je hnána přes fázi stacionární pomocí tohoto toku. Molekuly se dělí na základě jejich rozdílných rozdělovacích koeficientů mezi mobilní a stacionární fází. Neutrální molekuly jsou separovány v závislosti na jejich interakci se stacionární fází. U separace nabitých částic je separace podporována ještě rozdílem elektroforetických pohyblivostí [18].

2.4.6 Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF)

Metoda se používá k separaci amfolytů (např. proteinů) podle jejich izoelektrického bodu (pI) v gradientu pH. Látky amfolytické povahy obsahují slabě kyselou funkční skupinu i slabě bazickou funkční skupinu. V závislosti na pH prostředí mohou tedy molekuly nést kladný,

záporný nebo neutrální náboj. Izoelektrický bod představuje hodnotu pH prostředí, při kterém má amfolytická molekula nulový náboj [18].

Během separace molekuly analytu migrují pH gradientem do místa svého izoelektrického bodu. Gradient pH je rozložen tak, že u anody je pH prostředí nejnižší a u katody naopak nejvyšší. Pokud se amfolytická molekula (protein) dostane do prostředí nižšího pH než je její pI, získá záporný náboj. Záporně nabitá molekula putuje k anodě (směr klesajícího pH). Jakmile dosáhne molekula pH elektrolytu, které je rovné jejího pI získá neutrální náboj a její migrace se zastaví.

Během fokusace vznikají poměrně úzké, nerozmývající se zóny. Molekula, která vejde do jiné zóny, získá znovu náboj a opět se vrátí do jí příslušné zóny. Ustálený stav zón se projeví poklesem elektrického proudu na nulu. Zóny se pak vhodným způsobem (např. tlak) posouvají k detektoru, kde jsou analyzovány [16], [17].

2.4.7 Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC)

Metoda MECC byla vyvinuta pro separaci nenabitých sloučenin, které nejsou separovatelné elektroforézou. Tato technika leží na pomezí mezi chromatografií a elektroforézou.

Při MECC se používá elektrolyt o vysokém pH s obsahem vhodného tenzidu. Ten se přidává do základního elektrolytu v koncentracích vyšších, než je tzv. kritická micelární koncentrace. Dochází k vytváření micel, jejichž hydrofilní části jsou umístěny ve vnější vrstvě a hydrofobní řetězce tvoří nepolární jádro [15], [17].

Analyt se rozdělí mezi fázi elektrolytu (vodnou) a micelární podle chemické afinity, čímž dochází k separaci. Polárnější látky zůstávají delší dobu ve vodné fázi a jsou unášeny EOF. Naopak látky vysoce nepolární jsou vázány v micelách. Pro stanovení migračního času micel se používají ve vodě nerozpustná organická barviva (např. Sudan III) nebo další hydrofobní organické látky. Mezi těmito dvěma krajními fázemi se pohybují analyty, které nejsou krajně polární nebo nepolární. Migrační časy těchto analytů závisí na jejich rozdělovacím koeficientu mezi vodnou a micelární fází [15], [17], [22].

2.5 Kapilární izotachofóza (CITP)

2.5.1 Princip

CITP patří mezi nejstarší kapilární elektromigrační techniky. V krátké době umožňuje získat snadno vyhodnotitelné kvalitativní i kvantitativní údaje o složení daného vzorku. Technika je vhodná pro separaci iontů, ale nedá se použít pro neutrální molekuly. V rámci jednoho měření se dají analyzovat pouze anionty nebo kationty. Separace iontů probíhá na základě jejich rozdílných elektroforetických pohyblivostí.

Hlavní odlišností CITP od ostatních elektromigračních technik je to, že vzorek je vnášen mezi dva různé elektrolyty s odlišnou pohyblivostí analyzovaného typu iontů. Jeden elektrolyt se nazývá vedoucí (leading, L) a druhý koncový (terminating, T). Vedoucí elektrolyt obsahuje ionty, které mají stejný náboj jako analyzovaný vzorek, ale vyšší elektroforetickou pohyblivost než všechny separované ionty. Ionty koncového elektrolytu mají opět stejné znaménko jako separované ionty analytu, ale pohybují se nižší elektroforetickou pohyblivostí než všechny ionty vzorku. Během procesu separace vytvoří ionty jednotlivé zóny mezi

vedoucím a koncovým elektrolytem [15], [18]. Základní rozdíly mezi izotachoforézou a elektroforézou jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 3).

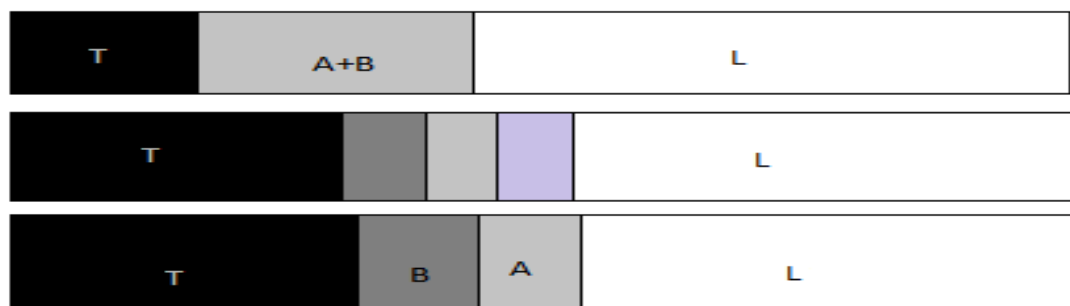
Tabulka 3: Základní rozdíly mezi izotachoforézou a elektroforézou [12]

Izotachoforéza	Elektroforéza
konstantní proud	konstantní napětí
jednotlivé zóny vzorku na sebe navazují	jednotlivé zóny vzorku jsou odděleny
samozaostřující efekt brání rozmývání zón	molekulární difúze způsobuje rozmývání zón
rychlost pohybu zón je ve stacionárním stavu konstantní	zóny se pohybují různými rychlostmi
jednotlivé zóny se liší potenciálovým spádem	potenciálový spád je rovnoměrný po celé délce kapiláry

2.5.2 Průběh izotachoforézy

Zařízení, ve kterém probíhá izotachoforetický proces bývá standardně rozděleno na tři části, jimiž jsou katodový, anodový a separační prostor. Před začátkem separace je v koloně a v oblasti elektrody, ke které ionty migrují, obsažen vedoucí elektrolyt. Prostor druhé elektrody naopak obsahuje elektrolyt koncový. Analyzovaný vzorek se vnáší na rozhraní mezi tyto dva elektrolyty. Kromě separovaných kationtů jsou v roztoku přítomné i opačně nabitě protiionty, které zachovávají elektroneutralitu ve vznikajících zónách. Nejvhodnější variantou je shodnost těchto protiiontů ve vedoucím a koncovém elektrolytu i separovaném vzorku [15], [17], [22].

Po připojení stejnosměrného napětí se udržuje konstantní proud, který je řádově $10^2 \mu\text{A}$, a vzorek se začne separovat. Jednotlivé zóny vzorku vznikající mezi vedoucím a koncovým elektrolytem se liší svými elektroforetickými pohyblivostmi. Rychlejší ionty se dostávají do popředí, zatímco pomalejší se opoždují. Směsná zóna vzorku se zmenšuje a následně úplně zmizí. Po určité době se tedy dosáhne ustáleného stavu. Jednotlivé vzniklé zóny vzorku se pohybují za sebou, podle klesajících elektroforetických pohyblivostí iontů v nich obsažených, směrem k detektoru [16], [17], [18], [22]. Postupný průběh izotachoforézy je názorně znázorněn na obrázku (Obrázek 2).



Obrázek 2: Průběh izotachoforézy

2.5.3 Základní charakteristika izotachforetických zón

- Pokud bylo dosaženo úplné separace směsi, obsahuje každá zóna pouze jeden druh iontů.
- Jednotlivé zóny jsou uspořádané za sebou mezi vedoucím a koncovým elektrolytem podle klesajících elektroforetických pohyblivostí.
- Fyzikální vlastnosti systému se od zóny k zóně mění skokově.
- Koncentrace iontů v jednotlivých zónách jsou konstantní.
- Všechny zóny se pohybují konstantní rychlostí, což zajišťuje potenciálový spád, který je v každé zóně odlišný, a proto se i méně pohyblivé ionty pohybují stejnou rychlostí jako ionty pohyblivější (na pomalejší ionty působí větší hnací síla).
- Zóny na sebe přímo navazují, protože elektrický proud nemůže být v žádném místě přerušen.
- Jednotlivé zóny jsou velmi ostré díky samozaostřujícímu efektu, což znamená, že pokud iont opustí svoji zónu, začne na něj působit jiný gradient potenciálu, který zajistí jeho návrat do správné zóny.
- Všechny zóny obsahují stejný druh protiiontů, které jsou shodné s protiionty ve vedoucím a koncovém elektrolytu [18], [23].

2.5.4 Instrumentace

Aparatura pro CITP je poměrně jednoduché zařízení. Separačním prostorem je kapilára, jejíž konce jsou spojeny s elektrodovými komůrkami. Tyto komůrky obsahují příslušné elektrolyty a platinové elektrody. Katoda i anoda v roztoku elektrolytu jsou od roztoku v kapiláře odděleny semipermeabilní membránou. Objem dávkovaného vzorku do separačního prostoru se pohybuje v μl [15].

2.5.4.1 Kapiláry

Vnitřní průměr používaných kapilár se pohybuje v rozmezí od 0,05 mm až po 0,8 mm. Používají se separační kapiláry, které zabraňují vzniku EOF, jelikož způsobuje deformaci izotachforetických zón. Izotachforetická separace se provádí v kapilárách z křemene nebo jiného vhodného organického polymeru (např. polytetrafluoroethylen, PTFE-kapiláry). Křemenné kapiláry mají vnitřní stěnu pokrytou vhodným stínícím povlakem (např. vrstvička hydroxycelulosa nebo polyvinylalkoholu). PTFE-kapiláry na svém vnitřním povrchu nenesou žádné disociovatelné funkční skupiny [15], [18].

2.5.4.2 Detektory

Detektory se v rámci nejdůležitějšího rozdělení zařazují do dvou skupin podle toho, jaké skupiny látek poskytují odezvu pro detektor. Rozlišujeme detektory univerzální a specifické.

Univerzální detektory zaznamenávají odezvu, jejíž velikost je přímo vázaná na efektivní pohyblivost separovaných iontů. Nejznámějším univerzálním detektorem je vodivostní detektor.

U selektivních detektorů souvisí jimi zaznamenaná odezva s jiným fyzikálně-chemickými vlastnostmi separovaných iontů, než je efektivní pohyblivost. Jako selektivní detektor se používá zejména fotometrický detektor.

Jedno z dalších možných kritérií rozděluje detektory na kontaktní a bezkontaktní, podle toho, zda je čidlo v přímém kontaktu s elektrolytem. V tomto případě jsou výhodnější detektory bezkontaktní, protože u kontaktních může docházet k nežádoucím interakcím.

V neposlední řadě se detektory mohou rozdělovat podle svých nižších nebo vyšších detekčních schopností [17], [23].

2.5.5 Vyhodnocení

Výstupem izotachforetické separace je schodovitý záznam, izotachforegram/izotachforeogram. Každý schod reprezentuje jeden iont. Výška jednotlivých schodů závisí na iontech, které zastupují. Délka schodu je úměrná množství iontu, které se nachází v separovaném vzorku [18].

2.5.5.1 Kvalitativní analýza

V rámci kvalitativního vyhodnocování izotachforegramu určíme relativní polohu (výšku) schodu vzhledem k poloze vedoucího a koncového elektrolytu. Pro stanovení relativní výšky lze použít následující rovnici:

$$h_{rel} = \frac{h_I - h_L}{h_T - h_L} \quad (7)$$

Jednotlivé veličiny zastupují výšky schodů, přičemž h_L je vedoucí elektrolyt, h_T koncový elektrolyt a h_I iont.

Získaná relativní poloha se porovnává s relativními polohami iontů, které v analyzovaném vzorku očekáváme. Pro další potvrzení identity zóny se provádí přidání standardu stanovované složky do analyzovaného vzorku. Zóna odpovídající standardu se oproti ostatním prodlouží [20].

2.5.5.2 Kvantitativní analýza

Pro určení množství daného iontu ve vzorku je rozhodující délka schodu v izotachforegramu. Po dosažení stacionárního stavu se délka schodů nemění a je úměrná koncentraci iontu ve vzorku.

Nejjednodušší a nejpoužívanější způsob kvantitativní analýzy je sestrojení kalibrační přímky. Pro určení koncentrace stanovované látky se využívá grafické závislosti délky zóny na koncentraci. Tento způsob nalézá využití hlavně u sériových analýz. Další možností je metoda standardního přídávku, kdy se porovnává délka zóny vzorku s délkou zóny vzorku s přídavkem standardu. Tato metoda je použitelnější, pokud se jedná o jednotlivé analýzy [20].

2.5.6 Využití

Metoda CITP nachází dnes v analytické praxi poměrně široké uplatnění. Vhodnou volbou podmínek (elektrolytického systému) umožňuje CITP řešit naprosto odlišné analytické úkoly. Omezení jejího aplikačního využití pouze na molekuly nesoucí náboj může představovat určitou separační výhodu. Neutrální molekuly, které jsou často majoritními složkami analyzovaného vzorku, neruší analýzu nabitých částic [21].

CITP je úspěšně aplikovatelná pro analýzu vody a potravin. V lékařství se používá pro analýzu léčiv nebo reálných vzorků lidských tekutin. V oblasti analýzy potravin se nejvíce

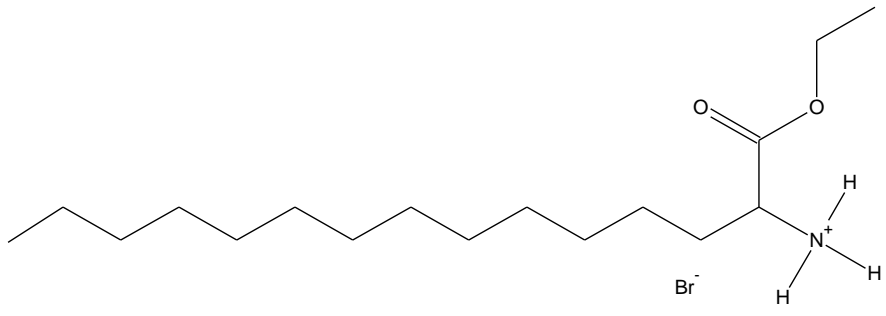
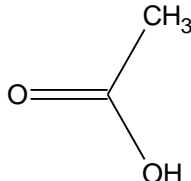
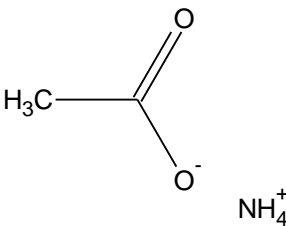
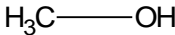
používá pro stanovení organických kyselin a bází, dusičnanů a konzervačních látek, například benzoové nebo sorbové kyseliny. Své uplatnění najde i při analýze anorganických iontů, aminokyselin, vitamínů rozpustných ve vodě, bílkovin, antioxidantů a toxinů. V oblasti analýzy vod se stanovují běžně přítomné ionty, ale například i fenoly, aldehydy, kvartérní amoniové soli, herbicidy a insekticidy [15], [16].

2.5.6.1 Kombinace CITP a CZE

Pro analýzu stopových množství analytů v komplexních matricích s proměnlivým složením je nejlepší možností metoda kombinace CITP a CZE. Nejdůležitější je volba vhodného elektrolytického systému pro izotachoforetický i zónově elektroforetický krok. Analyzovaný vzorek nejprve migruje metodou CITP, kde dochází k přečištění a zakoncentrování zón analytů. Následně dochází k plynulému přechodu do CZE a konečné separaci analytů. Spojením metod je dosaženo zvýšení citlivosti [15], [16].

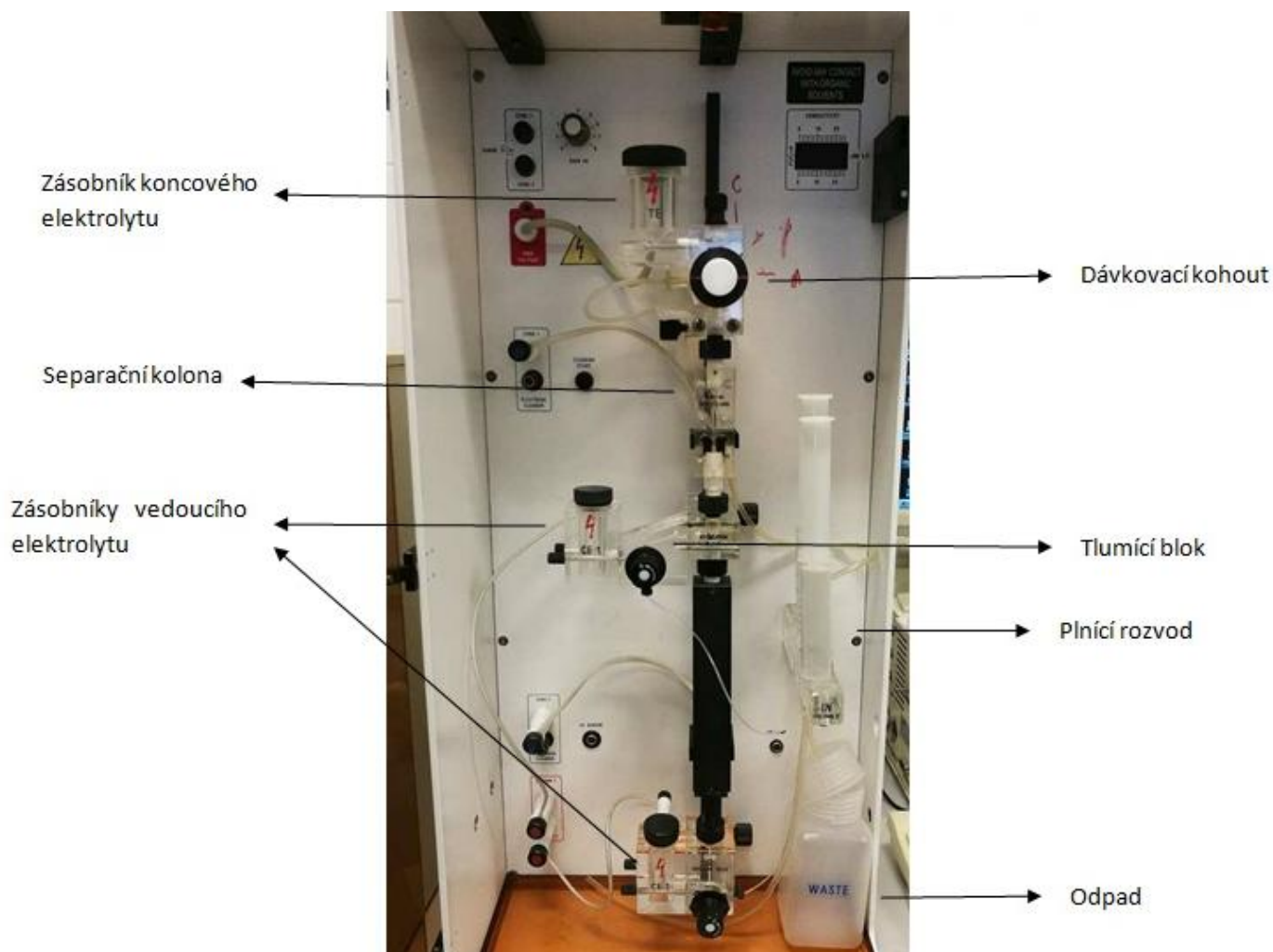
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité chemikálie

<p>Septonex, p. a. $C_{21}H_{44}BrNO_2$ Mr = 422,28 CAS: 10567-02-9; Tamsa a. s., ČR</p> 
<p>Kyselina octová, p. a. CH_3COOH Mr = 60,05 CAS: 64-19-7; Fluka, Německo</p> 
<p>Octan amonný, p. a. CH_3COONH_4 Mr = 77,0825; CAS: 631-61-8; Sigma-Aldrich; Německo</p> 
<p>Methanol, p. a. CH_3OH Mr = 32,042; CAS: 67-56-1; Penta, ČR</p> 

3.2 Použité přístroje a zařízení

Všechny látky v pevném skupenství byly navažovány na analytických vahách Scaltec SPB 31 (max. 210 g, d = 0,1 mg). Dále bylo pro přípravu analyzovaných vzorků použito standardní laboratorní vybavení. Obsah septonexu byl stanovován elektroforetickým analyzátozem Villa Labeco 100, Spišská Nová Ves, Slovensko. Analyzátor je popsán na obrázku (Obrázek 3).



Obrázek 3: Elektroforetický analyzátor Villa Labeco100

3.3 Software použitý pro zpracování dat

Všechny naměřené výsledky byly zpracovány pomocí programu pro elektroforetický analyzátor Villa Labeco 100 – ITPWin. Získaná data byla vyhodnocována s využitím programu Microsoft Office Excel.

3.4 Příprava a výběr elektrolytů

3.4.1 Vedoucí elektrolyt

Vedoucí elektrolyty byly připraveny s použitím výše uvedených chemikálií. Podle aplikačních listů [13] a [14] byly nejprve použity elektrolyty následujícího složení:

- $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ octan amonný + $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny octové
v 99% methanolu
- $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ octan amonný + $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyseliny octové
v 50% methanolu

Tyto elektrolyty však neměly dostatečně dobrou odezvu pro reálné vzorky. Rovněž prostředí 99%, ani 50% methanolu se ukázalo jako nevhodné pro dané přístrojové vybavení. Především z tohoto důvodu byl použit vedoucí elektrolyt následujícího složení:

- $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ octan amonný + $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselina octová
v 15% methanolu

3.4.2 Koncový elektrolyt

Koncové elektrolyty byly připraveny s použitím výše uvedených chemikálií v následujících koncentracích:

- $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ MgCl_2 v 99% methanolu dle aplikačního listu [13]
- $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselina octová v 50% methanolu dle aplikačního listu [14]

Tyto elektrolyty se také ukázaly jako nevhodné. Byl tedy zvolen koncový elektrolyt o složení:

- $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ kyselina octová v 15% methanolu

3.5 Podmínky analýzy

Pro všechna měření byla použita separační kolona délky 90 mm s vnitřním průměrem kapiláry 0,8 mm. Hnací proud použitý při analýze byl $250 \text{ } \mu\text{A}$. Prvních 200 s analýzy nebylo obvykle zaznamenáváno, neboť se jednalo pouze o odezvu vedoucího elektrolytu. Pro zaznamenání odezvy byl použit vodivostní detektor.

3.6 Optimalizace metody

Pro získání vhodných podmínek pro izotachforetické stanovení septonexu byly postupnými kroky hledány optimální parametry analýzy. Konkrétně se jedná o:

- Výběr vhodného ředění – porovnávány byly tři možná ředění reálných vzorků: 4krát, 5krát a 6krát
- Výběr vhodné koncentrace přídavku – proměřovány byly tři koncentrace standardu septonexu: $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,07 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- Výběr vhodného množství přídavku – pro optimalizaci metody byly rovněž zkoušeny tři objemy přídavků: 0,5 ml; 1 ml a 1,5 ml
- Kalibrační závislost – byla sestrojena závislost délky zóny na koncentraci standardu septonexu v rozmezí $0,01\text{--}0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
- Analýza reálných vzorků – všechny vzorky byly připraveny k analýze podle optimalizace v předchozích bodech a následně 5krát proměřeny

Jednotlivé kroky jsou popsány v kapitole 4.

3.7 Metoda standardního přídavku

Obsah septonexu v reálných vzorcích byl stanoven metodou standardního přídavku dle následujícího vztahu:

$$c_x = \frac{l_x \cdot c_s \cdot V_s}{l_{x,s} \cdot V_{x,s} - l_x \cdot V_x} \quad (8)$$

kde: c_x je koncentrace analytu ve vzorku

l_x je délka zóny vzorku

c_s je koncentrace standardu

V_s je objem přidaného standardu

$l_{x,y}$ je délka zóny po přidavku standardu

$V_{x,s}$ je objem po přidavku standardu

V_x je objem vzorku

Pro přepočet na skutečné hodnoty koncentrace, pro možnost srovnání uvedeno v $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, bylo dále bráno v úvahu ředění vzorků a molární hmotnost analytu.

3.8 Statistické zpracování naměřených dat

3.8.1 Dean-Dixonův test

Při zpracování výsledků měření byl proveden Dean-Dixonův test odlehlých hodnot:

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1} \quad (9)$$

$$Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad (10)$$

kde Q zastupuje kritické hodnoty, x_1 je nejnižší hodnota ze série měření, x_n zastupuje nejvyšší hodnotu série měření a x_2 a x_{n-1} představují hodnoty sousedící s nejnižší a nejvyšší hodnotou. Kritické hodnoty Q jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 4).

Tabulka 4: Kritické hodnoty Q pro 3-6 hodnot a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ [24]

n	Q_n
3	0,941
4	0,765
5	0,642
6	0,560

3.8.2 Interval spolehlivosti

Spolehlivost výsledků vyjádřena intervalem spolehlivosti dle způsobu, který byl navržen Dean-Dixonem pro malé soubory výsledků, využívá Lordovo rozdělení a je vyjádřeno vztahem:

$$L_{1,2} = \bar{x} \pm K_\alpha \cdot R \quad (11)$$

kde $L_{1,2}$ označují krajní meze intervalu spolehlivosti, \bar{x} je aritmetický průměr hodnot, K_α je kritická hodnota Lordova rozdělení pro zvolenou hladinu významnosti a R je rozdíl mezi maximální a minimální hodnotou. Kritické hodnoty K_α jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5: Kritické hodnoty K_α pro 3-6 hodnot a hladinu významnosti $\alpha = 0,05$ [24]

n	K_α
3	0,941
4	0,765
5	0,642
6	0,560

3.8.3 Mez detekce a kvantifikace

Mez detekce (Limit of detection – LOD) odpovídá nejnižší možné koncentraci analytu, která poskytne analytický signál statisticky odlišný od šumu. Mez kvantifikace (Limit of quantification – LOQ) představuje koncentraci, jejíž přesnost dovoluje kvantitativní stanovení. Mez detekce a mez kvantifikace byly stanoveny pomocí rovnice 12 a rovnice 13.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_a}{m} \quad (12)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_a}{m} \quad (13)$$

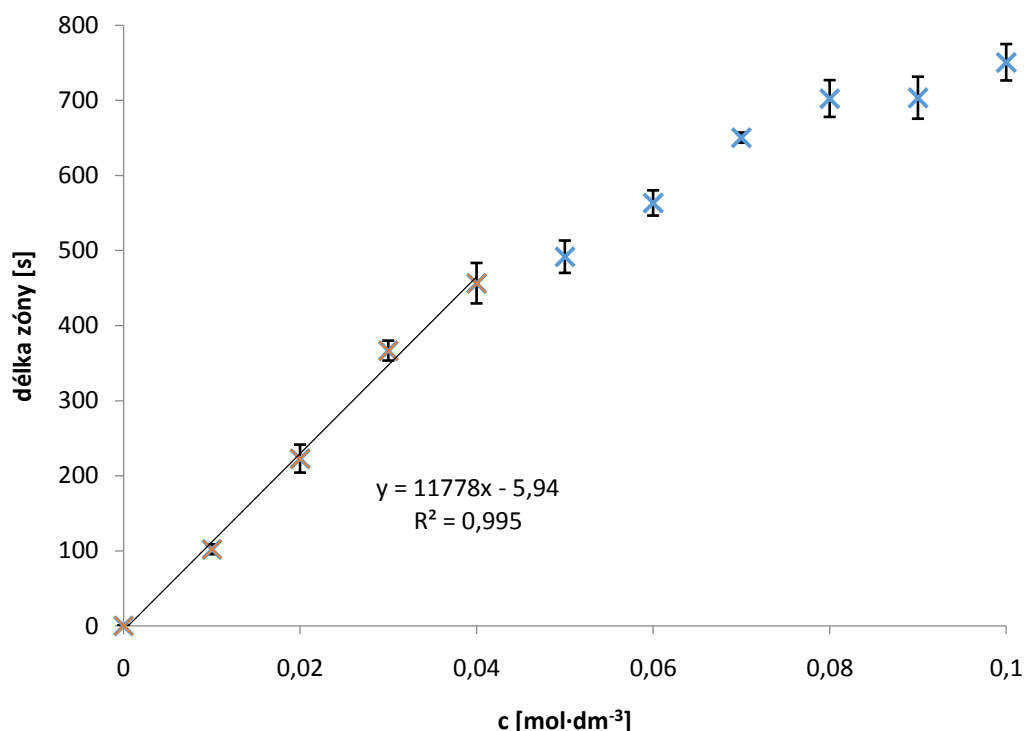
kde m je směrnice kalibrační přímky a s_a je směrodatná odchylka směrnice lineární závislosti, získaná využitím programu Microsoft Excel, analýza dat.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace metody stanovení

4.1.1 Kalibrační křivka

Pro sestavení kalibrační křivky byly proměřeny standardní roztoky septonexu v koncentračním rozmezí $0,01\text{--}0,1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ v 15% metanolu, každý 5krát (viz. Obrázek 4).



Obrázek 4: Kalibrační křivka standardu septonexu

Jak je z obrázku (Obrázek 4) patrné, kalibrační křivka je lineární pouze v oblasti $0\text{--}0,04\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Pro stanovení obsahu septonexu v reálných vzorcích nebyla využívána kalibrační křivka, ale metoda standardního přídavku pro odstranění vlivů matrice.

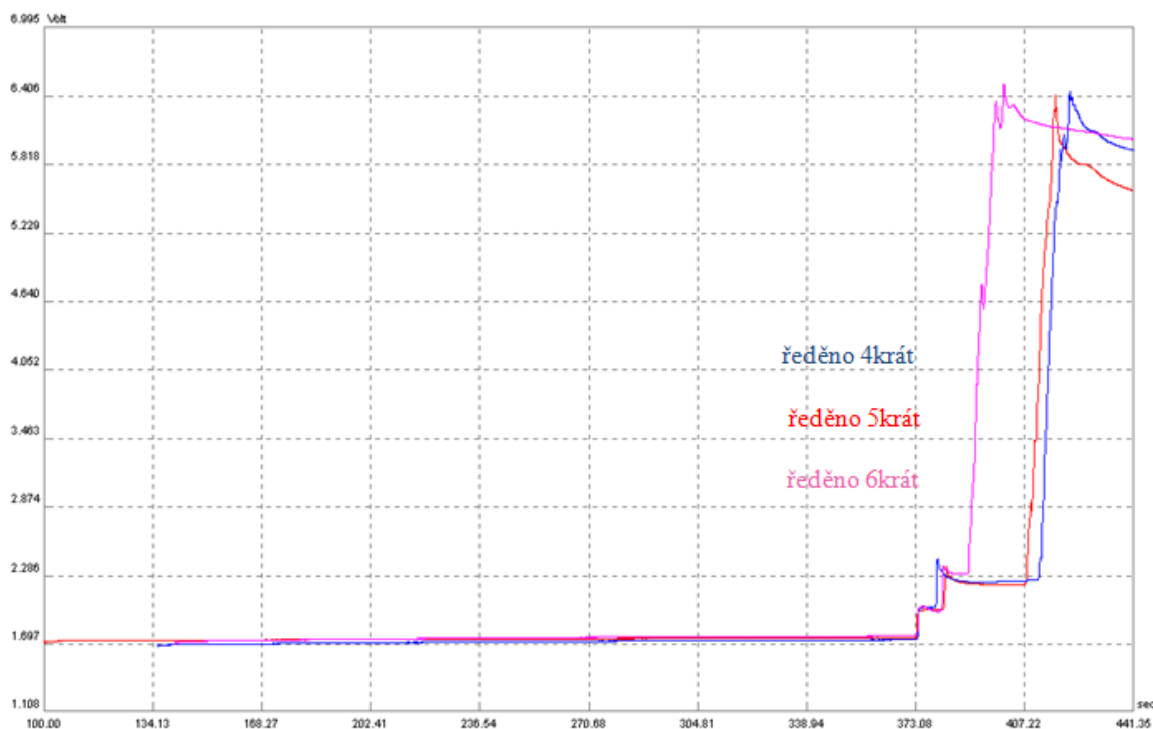
Rovnice kalibrační křivky byla využita pro výpočet hodnot LOD a LOQ dle vztahů uvedených v kapitole 3.8.3. Výsledné hodnoty LOD a LOQ jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 6).

Tabulka 6: Hodnoty LOD a LOQ

LOD	2,132	$[\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}]$
LOQ	7,107	$[\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}]$

4.1.2 Výběr vhodného ředění

Pro použití metody standardního přídávku bylo nutné reálné vzorky vhodně naředit tak, aby se analyzovaný obsah pohyboval v lineární části kalibrační křivky. Reálné vzorky byly ředěny 4krát, 5krát a 6krát. Jednotlivá ředění jsou zobrazeny na obrázku (Obrázek 5).

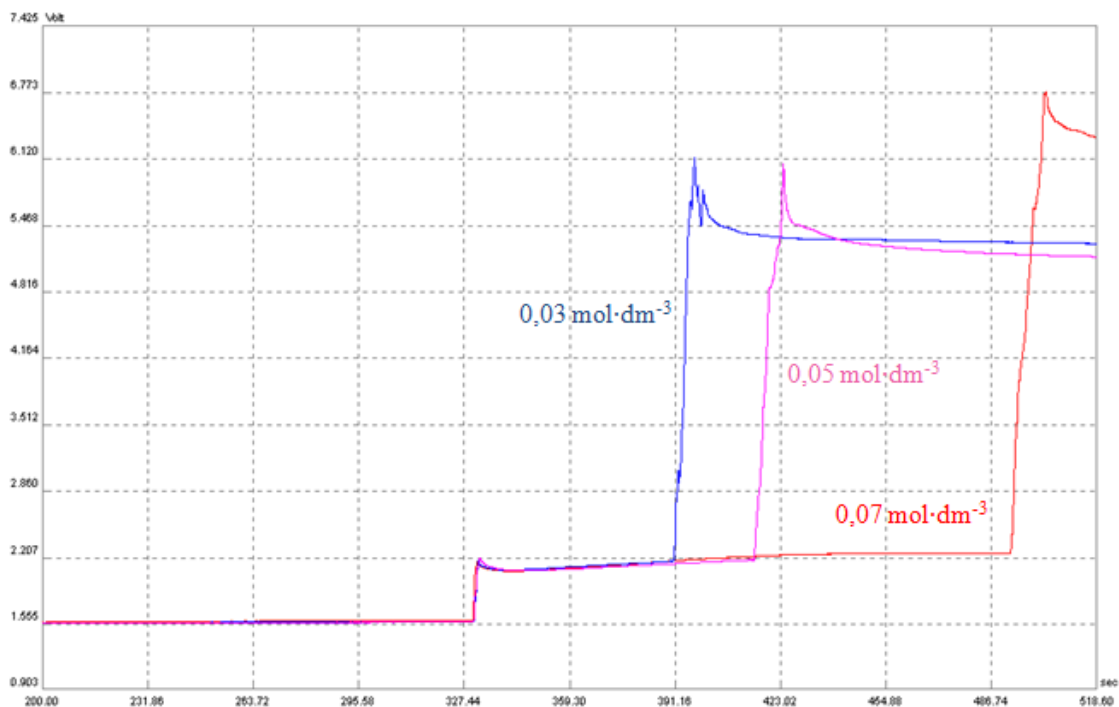


Obrázek 5: Odezvy analýz pro jednotlivá ředění

Při nejmenším ředění (4krát ředěno) je patrné, že odezva je poměrně velká již bez přidavku standardu. Po jeho přidání by se tedy výsledek mohl dostat za lineární oblast kalibrační křivky. Největší ředění (6krát ředěno) zase poskytuje poměrně malou odezvu. Nejvhodněji se tedy jeví ředění 5krát, které poskytuje přiměřenou odezvu jak pro samotný vzorek, tak i pro standardní přidavek. Všechny reálné vzorky byly tedy před měřením ředěny 5krát roztokem 15% methanolu.

4.1.3 Výběr vhodné koncentrace přídávku

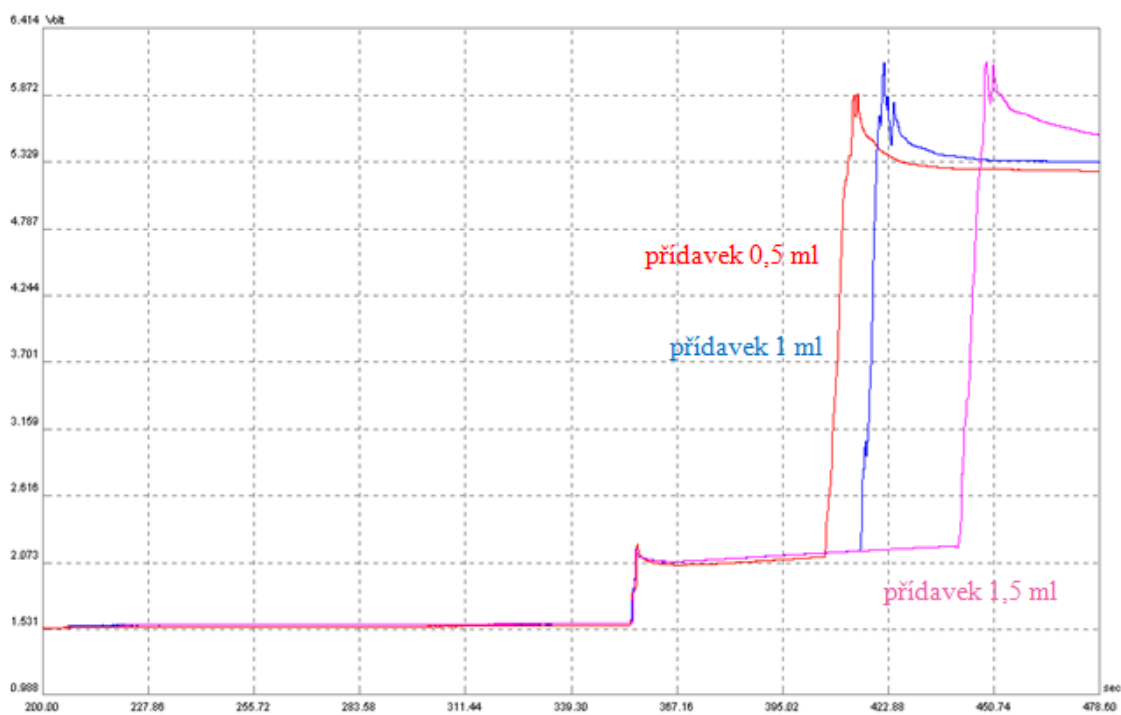
V rámci použití metody standardního přípravku byly proměřovány tři koncentrace přidávaného standardu septonexu, a to $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,07 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Pro měření reálných vzorků byla zvolena koncentrace $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Při koncentracích $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a $0,07 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byly získány výsledky v nelineární části kalibrační křivky. Odezvy pro přidavky standardu o různé koncentraci jsou zaznamenány na obrázku (Obrázek 6).



Obrázek 6: Odezvy analýzy pro různé koncentrace

4.1.4 Výběr vhodného množství přídavku

Pro vyhodnocení obsahu septonexu metodou standardního přídavku byly rovněž zkoušeny tři objemy přídavků; a to 0,5 ml; 1 ml a 1,5 ml $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ standardu septonexu v 15% methanolu. Ke všem analýzám reálných vzorků, a to 1 ml 5krát ředěného roztoku vzorku, byl přidáván 1 ml standardu septonexu o koncentraci $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, protože tento přídavek zaznamenával nejlepší odezvy. Odezvy jednotlivých množství přídavku jsou zaznamenány na obrázku (Obrázek 7).

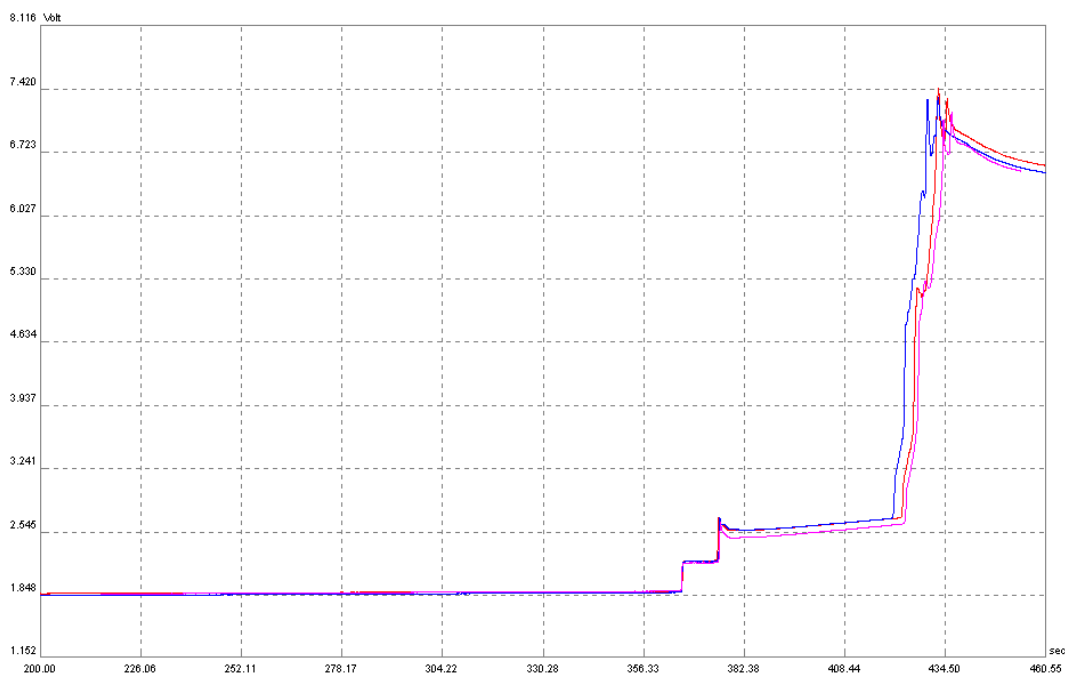


Obrázek 7: Odezvy analýzy pro různé objemy přídavku

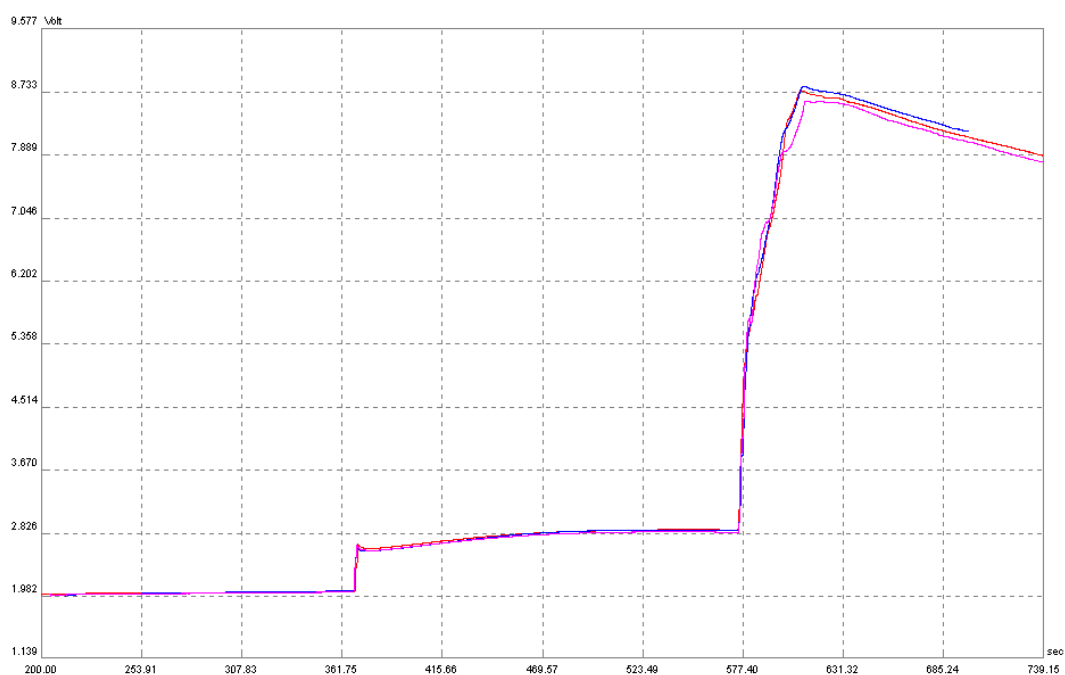
4.2 Analýza reálných vzorků

Pro stanovení obsahu septonexu byly reálné vzorky před měřením 5krát zředěny roztokem 15% methanolu. Nejprve byl 5krát proměřen pouze zředěný vzorek. Následně byl opět 5krát proměřen zředěný vzorek s přidavkem 1 ml $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ roztoku standardu septonexu v 15% methanolu.

Vhodným výběrem ředění, objemem a koncentrací standardního přídatku a nastavenými parametry měření bylo dosaženo optimální reprodukovatelnosti jednotlivých analýz. Reprodukovatelnost měření ředěného roztoku reálného vzorku i standardního přídatku je zobrazena na obrázcích (Obrázek 8, Obrázek 9).



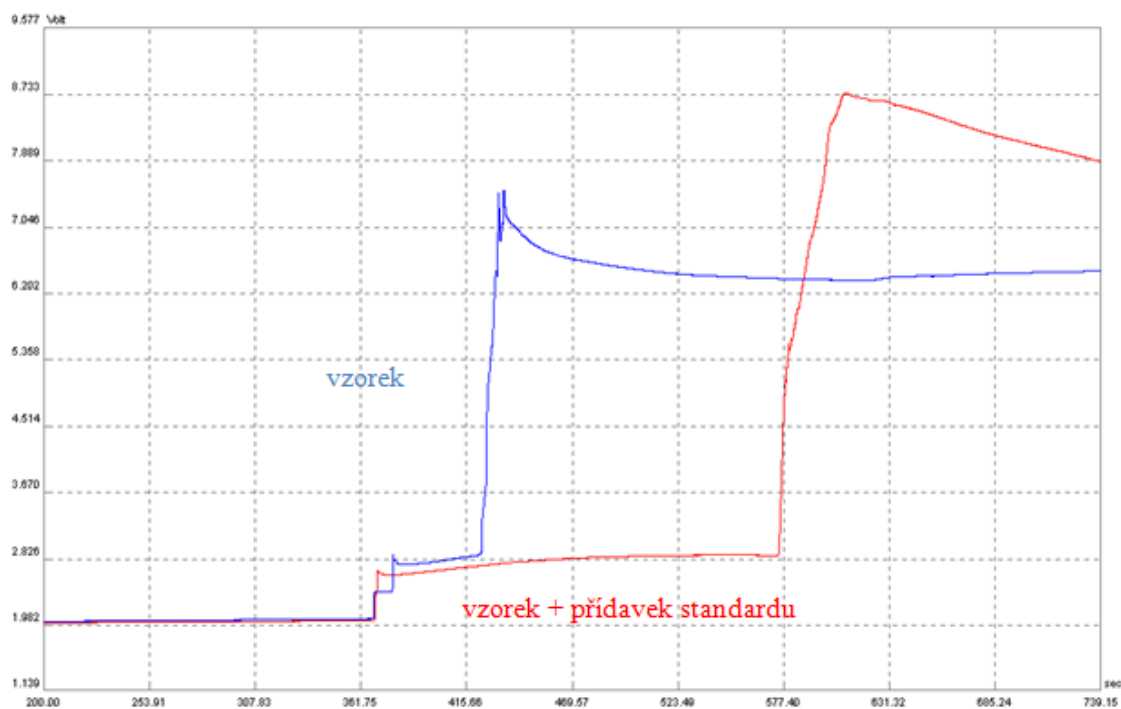
Obrázek 8: Reprodukovanost měření vzorku (ředění)



Obrázek 9: Přídavek k reálnému vzorku – reprodukovanost přídatku

Jak je z výše uvedených obrázků (Obrázek 8 a Obrázek 9) patrné, měření samostatných vzorků a podobně i standardních přídavek probíhalo reprodukovatelně. Obvykle se rozdíly pohybovaly v jednotkách %. Případné, spíše výjimečné, odlehle hodnoty byly Dean-Dixonovým testem vyloučeny.

Na dalším obrázku (Obrázek 10) je patrné prodloužení odezvy po přidání 1 ml $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ standardu septonexu v 15% methanolu oproti pouze ředěnému reálnému vzorku. Prodloužení určité zóny slouží jak ke kvalitativnímu určení analytu (prodloužení určité odezvy), tak pro kvantitativní stanovení septonexu metodou standardního přídavku.



Obrázek 10: Srovnání záznamu analýz

Získaná data dokazují, že použití metody standardního přídavku se jeví jako vhodné pro stanovení obsahu septonexu v reálných vzorcích za využití ITP. Díky optimální reprodukovatelnosti měření a přijatelné odezvy septonexu po přidavku $0,03 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ standardu v 15% methanolu mohl být u jednotlivých vzorků stanoven obsah septonexu, jakožto hlavní účinné látky.

4.3 Výsledky stanovení množství septonexu v reálných vzorcích

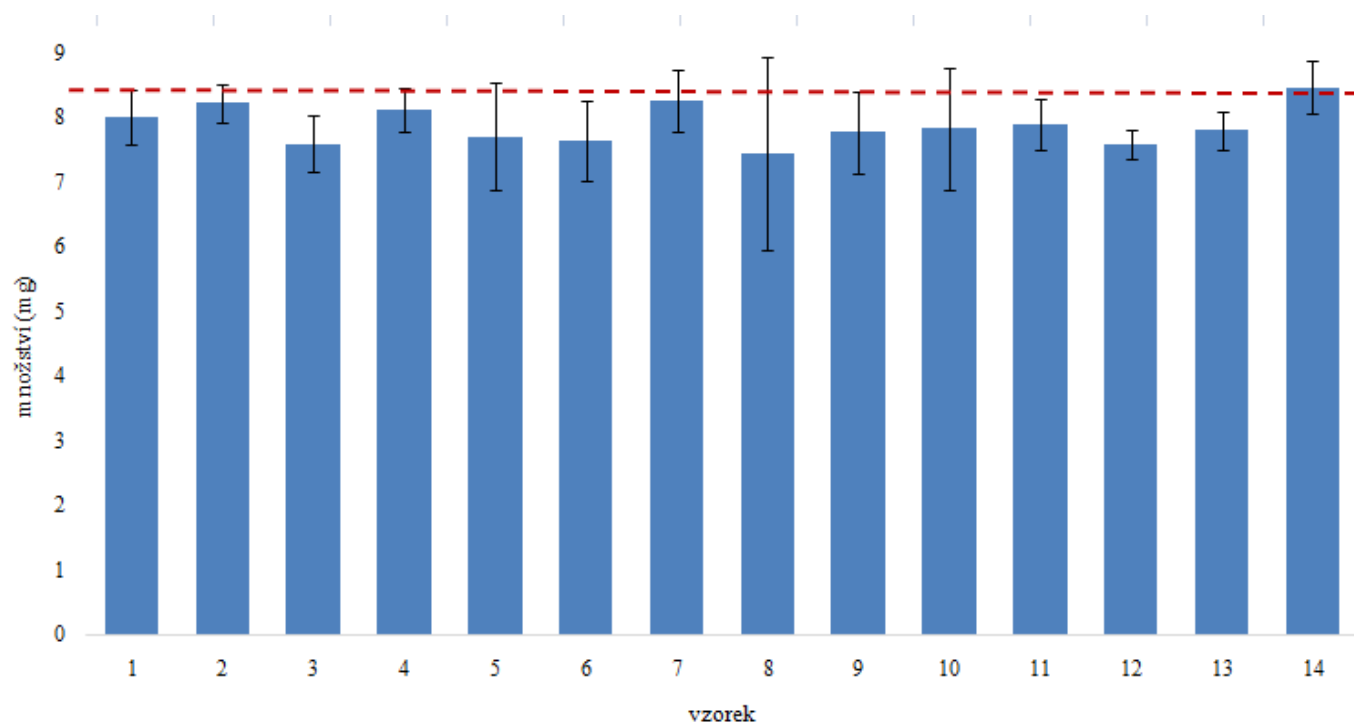
Analyzováno bylo několik reálných vzorků přípravku Septonex sprej. Jednotlivé vzorky přípravku se lišily datem spotřeby a výrobní šarží.

V přípravku Septonex sprej udává výrobce koncentraci účinné látky septonex $8,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Výsledky stanovení obsahu septonexu v reálných vzorcích jsou zaznamenány v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Výsledky reálných vzorků

Vzorek	Koncentrace [mg·ml ⁻¹]	Číslo šarže	Datum spotřeby
1	8,02 ± 0,43	3A103054	03. 2003
2	8,23 ± 0,29	3A103054	03. 2003
3	7,60 ± 0,44	3A103054	03. 2003
4	8,12 ± 0,34	3A702113	02. 2010
5	7,72 ± 0,82	3A702113	02. 2010
6	7,65 ± 0,61	3A810045	10. 2011
7	8,27 ± 0,49	3A807058	07. 2011
8	7,45 ± 1,50	3A904047	04. 2012
9	7,78 ± 0,64	3A904047	04. 2012
10	7,84 ± 0,95	3A904047	04. 2012
11	7,90 ± 0,39	3A904047	04. 2012
12	7,59 ± 0,22	3A303066	03. 2016
13	7,81 ± 0,30	3A503004	03. 2018
14	8,48 ± 0,41	3A503004	03. 2018

Z tabulky je patrné, že výsledné hodnoty nalezeného obsahu analytu v přípravku Septonex sprej jsou velmi blízké výrobcem deklarovanému obsahu. Rozdílné hodnoty mezi jednotlivými přípravky mohou být způsobeny odlišnou výrobní šarží nebo datem spotřeby. Výkyvy hodnot v rámci stejných šarží mohly vzniknout rozdílnými podmínkami uskladnění přípravků nebo odchylkami v podmínkách analýzy jednotlivých měření, které nemohly být přímo ovlivněny. Graficky je tato skutečnost zobrazena na obrázku (Obrázek 11).



Obrázek 11: Hmotnostní zastoupení septonexu v jednotlivých vzorcích, kdy červená přerušovaná čára udává deklarované množství výrobcem

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit množství účinné látky septonex v lécích běžně dostupných na českém trhu metodou kapilární izotachoforézy a porovnat získané výsledky s obsahem septonexu, který udává výrobce. V rámci práce byla optimalizována metoda pro stanovení obsahu septonexu v přípravku Septonex sprej.

Septonex sprej je volně prodejný dezinfekční přípravek, který nemá na českém trhu zatím žádnou přijatelnou alternativu. Při vyšších koncentracích způsobuje septonex podráždění, a proto je nutné optimalizovat vhodnou metodu pro jeho kvalitativní i kvantitativní stanovení.

V souladu se zadáním této bakalářské práce byla optimalizovaná metoda pro stanovení septonexu, která je spolehlivě použitelná pro analýzu. Pro kvantitativní stanovení byla sestrojena kalibrační křivka, která však ve vyšších koncentracích postrádala linearitu. Kvůli odstranění vlivů matrice byla jako nejvhodnější metoda pro vyhodnocení zvolena metoda standardního přídatku.

Množství septonexu udávané výrobcem bylo nepatrně vyšší než ukázaly analýzy. V rámci statistického zpracování s intervalem spolehlivosti výsledků jsou však získané hodnoty výrobcem deklarované hodnotě velmi blízké. Výkyvy hodnot mezi jednotlivými stanovenými koncentracemi analytu v přípravku Septonex sprej, mohou být způsobeny odlišnými šaržemi léků nebo odlišným datem spotřeby. Nejednota výsledků stejných šarží mohla vzniknout odlišnými podmínkami uskladnění.

Stanovení septonexu pomocí kapilární izotachoforézy je časově poměrně nenáročné. Doba analýzy byla optimalizována na řádově minuty, stejně jako příprava reálných vzorků. Z výsledků práce vyplývá, že metoda stanovení septonexu s využitím kapilární izotachoforézy může úspěšně konkurovat metodám jakými jsou vysoce účinná kapalinová chromatografie a kapilární elektroforéza.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Český lékopis 2005*. Praha: Grada, 2005. ISBN 8024715325.
- [2] WENKE, Maxmilián. *Farmakologie: učebnice pro lékařské fakulty*. Vyd. 2. Praha: Avicenum, 1990. ISBN 8020100288.
- [3] SUCHOPÁR, Josef. *Remedia Compendium*. 3. přeprac. a rozš. vyd. Praha: PANAX, 1999. ISBN 8090212654.
- [4] *Příbalová informace: informace pro uživatele: Septonex*. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0122520&tab=texts>
- [5] *Souhrn údajů o přípravku: Septonex*. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0122520&tab=texts>
- [6] *Příbalová informace: informace pro uživatele: Ophthalmo-Septonex*. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0000876&tab=texts>
- [7] *Souhrn údajů o přípravku: Ophthalmo-Septonex*. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0000876&tab=texts>
- [8] *Souhrn údajů o přípravku: Mesocain*. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0002684&tab=texts>
- [9] *Souhrn údajů o přípravku: Mesocain*. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0002684&tab=texts>
- [10] *Souhrn údajů o přípravku: Otipur*. Dostupné z: <https://www.bioveta.cz/pripravky/veterinarni-pripravky/otipur-usni-kapky-roztok.html>
- [11] KOULA, Václav, Daria KUČOVÁ a Jiří GASPARIČ. Determination of Organic Bases by Ion-Pair Extraction Polarography Using Orange II as Counter Ion. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1992, **57**(11), 2272-2278.
- [12] KOPECKÝ, František, Mária VOJTEKOVÁ, Silvia KOVÁČOVÁ a Monika JURÍČEKOVÁ. Inclusion Complexation of Carbethopendecinium Bromide with Some α - and β -Cyclodextrins Studied by Potentiometry with Membrane Electrodes. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 2004, **69**(2), 384-396.
- [13] RECMAN. *Stanovení Septonexu v lékových přípravcích - 1*. Dostupné z: http://www.recman.cz/pdf/aplikacni_list_21.pdf
- [14] RECMAN. *Stanovení bromidu karbethopendecinia v přípravku Septonex spray, Ophthalmo-Septonex, Mukoseptonex a MukoseptonexE - 2*. Dostupné z: http://www.recman.cz/pdf/aplikacni_list_52.pdf
- [15] ČÁSLAVSKÝ, Josef a Jiří Georg Kamil ŠEVČÍK. *Analýza organických látek: učební text projektu "Příprava kurzů a učebních textů v oboru vzorkování a chemické analýzy" : modul K02-2014*. Český Těšín: 2 THETA, 2014. Analyticalstandards and equipment. ISBN 9788026070856.
- [16] *Elektroanalytické metody: sborník přednášek z kurzu*. Český Těšín: 2 Theta, 2001. Analytical standards and equipment. ISBN 8086380076.
- [17] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 8086369072.
- [18] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2004. ISBN 8024608529.
- [19] GAŠ, Bohuslav. Kapilární elektroforéza. *Vesmír*. 2001, **80**(7), 370-371.

- [20] PAZOUREK, Jiří. *Moderní Elektroforetické Analytické Metody: Přednášky pro magisterské studium*. Brno, 2.6.2003.
- [21] CHURÁČEK, Jaroslav. *Pokroky v teorii a instrumentaci moderních analytických metod*. Pardubice: Vysoká škola chemicko-technologická, 1985.
- [22] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Brno: VUTIUM, 2000. ISBN 8021417420.
- [23] KANIANSKÝ, Dušan. *Kapilární izotachoforéza: Základní principy*. Spišská Nová Ves: Ústav rádioekológie a využitia jadrovej techniky, Výrobno -vývojový závod prístrojov jadrovej techniky.
- [24] Tabulky. *Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci* [online]. [cit. 2017-05-12]. Dostupné z: <http://www.ach.upol.cz/ucebnice/tabulky.htm>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CPB	Karbethopendecinium bromid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
CITP	kapilární izotachoforéza
MECC	micelární elektrokinetická kapilární chromatografie
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární isoelektrická fokusace
CEC	kapilární elektrochromatografie
LE	vedoucí elektrolyt
TE	koncový elektrolyt